

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-148076

(43)公開日 平成6年(1994)5月27日

(51)Int.Cl.⁵
G 0 1 N 21/78
C 1 2 M 1/00
C 1 2 N 15/09
G 0 1 N 21/64

識別記号 庁内整理番号
C 7906-2 J
Z
Z 9115-2 J
8931-4 B

F I

技術表示箇所

C 1 2 N 15/ 00
審査請求 未請求 請求項の数29(全 16 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平4-300134

(22)出願日

平成4年(1992)11月10日

(71)出願人 000236436

浜松ホトニクス株式会社

静岡県浜松市市野町1126番地の1

(72)発明者 石川 満

静岡県浜松市市野町1126番地の1 浜松ホ
トニクス株式会社内

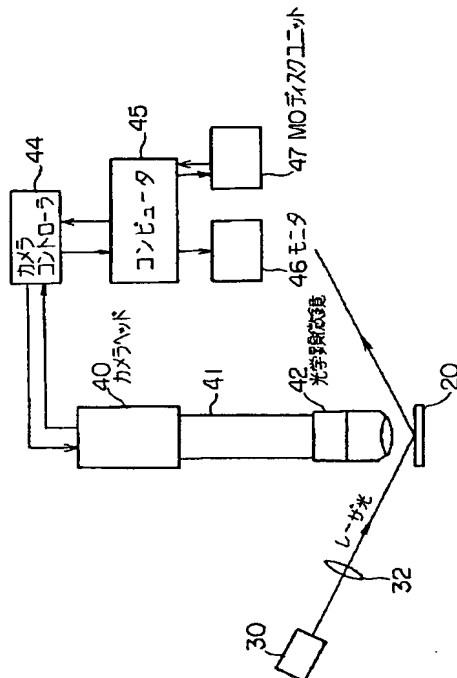
(74)代理人 弁理士 長谷川 芳樹 (外3名)

(54)【発明の名称】 核酸の塩基配列決定方法、単一分子検出方法、その装置及び試料の作成方法

(57)【要約】

【目的】 単一分子の検出を可能にする。

【構成】 蛍光性の分子を有する試料が付着した基板の局所領域に励起光を照射する光源と、前記局所領域内の前記蛍光性の分子からの蛍光強度を検出し、前記蛍光強度の頻度を測定する蛍光検出手段とを有し、前記蛍光検出手段は、前記励起光の前記基板への光路及び前記励起光の前記基板からの反射光路以外の位置に配置される。



1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 蛍光性の分子の溶液を微小な液滴状態にして鏡面度の高い基板の表面に付着させた後、自然乾燥をし、前記基板の局所領域に励起光を照射して前記蛍光性の分子からの量子化された蛍光強度を測定し、前記蛍光強度の出現頻度から前記局所領域の中の前記蛍光性の分子が单一の分子の状態であることを検出する单一分子検出方法。

【請求項2】 前記蛍光性の分子は、蛋白に蛍光分子が結合したものあるいは蛍光分子そのものであることを特徴とする請求項1記載の单一分子検出方法。

【請求項3】 前記蛍光性の分子は、複数の蛍光分子を含むことが可能であり、クロマトグラフィで特定数の蛍光分子を結合したものを分離精製して前記溶液を調製することを特徴とする請求項1記載の单一分子検出方法。

【請求項4】 前記蛍光性の分子の溶液は、微小な液滴状態で前記蛍光性の分子を1個程度含む濃度であることを特徴とする請求項1記載の单一分子検出方法。

【請求項5】 前記蛍光性の分子の溶液を高純度の溶媒で希釈することを特徴とする請求項1記載の单一分子検出方法。

【請求項6】 超音波にて前記蛍光性の分子を微小な液滴状態にすることを特徴とする請求項1記載の单一分子検出方法。

【請求項7】 前記蛍光性の分子を霧状に気体に分散させて前記基板に付着することを特徴とする請求項1記載の单一分子検出方法。

【請求項8】 前記基板は、シリコンウェハであることを特徴とする請求項1記載の单一分子検出方法。

【請求項9】 前記自然乾燥は室温若しくは室温以下で行うことを特徴とする請求項1記載の单一分子検出方法。

【請求項10】 前記励起光は、レーザ光であることを特徴とする請求項1記載の单一分子検出方法。

【請求項11】 前記蛍光強度を測定する検出器を前記励起光の前記基板への光路及び前記励起光の前記基板からの反射光路以外に配置して前記蛍光強度を測定することを特徴とする請求項1記載の单一分子検出方法。

【請求項12】 前記蛍光強度は、2次元のフォトカウンティングシステムによって検出し、画面上における前記蛍光強度の頻度分布から、その画面において前記蛍光性の分子が单一の分子の状態であることを検出することを特徴とする請求項1記載の单一分子検出方法。

【請求項13】 蛍光性の分子を超音波にて霧状に気体に分散させて鏡面度の高い基板に付着した後自然乾燥をすることを特徴とする单一分子検出用試料の作成方法。

【請求項14】 シリコンウェハの表面上に蛍光性の分子を付着してなる单一分子検出用試料。

2

【請求項15】 蛍光性の分子を有する試料が付着した基板の局所領域に励起光を照射する光源と、前記局所領域内の前記蛍光性の分子からの蛍光強度を検出し、前記蛍光強度の頻度を測定する蛍光検出手段とを有し、

前記蛍光検出手段は、前記励起光の前記基板への光路及び前記励起光の前記基板からの反射光路以外の位置に配置された单一分子検出装置。

【請求項16】 前記蛍光検出手段は、光学顕微鏡及び2次元の光検出器を含むフォトカウンティングシステムで構成されていることを特徴とする請求項15記載の单一分子検出装置。

【請求項17】 前記光学顕微鏡は、その倍率をかえることが可能であることを特徴とする請求項16記載の单一分子検出装置。

【請求項18】 前記基板は、清澄な雰囲気に配置されることを特徴とする請求項15記載の单一分子検出装置。

【請求項19】 前記光源は、レーザであることを特徴とする請求項15記載の单一分子検出装置。

【請求項20】 前記基板上の前記局所領域を相対的に移動させる手段をさらに備えることを特徴とする請求項15記載の单一分子検出装置。

【請求項21】 核酸の塩基を含む蛍光性分子の溶液を微小な液滴状態にして順次鏡面度の高い基板の表面に付着させた後、自然乾燥をし、

前記基板の局所領域に励起光を照射して前記蛍光性分子からの蛍光強度を測定し、前記量子化された蛍光強度の出現頻度から前記局所領域の中の前記蛍光性分子が单一の分子の状態であることを検出し、

前記蛍光性分子にパルス状に励起光を照射して前記蛍光性分子からの蛍光の波長分布及び寿命から前記蛍光性分子に含まれる核酸の塩基を特定して、

前記基板上の局所領域を移動させて順次核酸の塩基配列を決定する核酸の塩基配列決定方法。

【請求項22】 前記基板をシリコンウェハとし、その周に沿って前記蛍光性分子を付着することを特徴とする請求項21記載の核酸の塩基配列決定方法。

【請求項23】 前記蛍光性分子の溶液を超音波にて前記蛍光性の分子を1個程度含む微小な液滴状態にして前記基板に前記蛍光性分子を付着することを特徴とする請求項21記載の核酸の塩基配列決定方法。

【請求項24】 前記蛍光強度、前記蛍光の波長及び寿命を測定する検出器を前記励起光の前記基板への光路及び前記励起光の前記基板からの反射光路以外に配置して前記蛍光強度、前記蛍光の波長分布及び寿命を測定することを特徴とする請求項21記載の核酸の塩基配列決定方法。

【請求項25】 前記蛍光性分子は、前記塩基にモノクロナル抗体が付着したものであることを特徴とする請求

項21記載の核酸の塩基配列決定方法。

【請求項26】前記蛍光性分子は、抗体の連鎖反応による分子増倍過程にて形成されたものである請求項21記載の核酸の塩基配列決定方法。

【請求項27】核酸の塩基を含む蛍光性分子の溶液を付着した基板の局所領域に励起光を照射する光源と、前記局所領域内の前記蛍光性分子からの蛍光強度を検出し、前記蛍光強度の頻度から前記局所領域の中の前記蛍光性分子が単一の分子の状態であることを検出する第1の手段と、前記蛍光性分子にパルス状に励起光を照射して前記蛍光性分子からの蛍光の波長及び寿命を検出する第2の手段と、前記基板上の前記局所領域を移動させる第3の手段とを有し、前記第1及び第2の手段は、前記励起光の前記基板への光路及び前記励起光の前記基板からの反射光路以外の位置に配置された核酸の塩基配列測定装置。

【請求項28】前記第1及び第2の手段は、前記蛍光性分子からの蛍光を集光する光学顕微鏡を共用し、この光学顕微鏡を経た前記蛍光から検出する請求項27記載の核酸の塩基配列測定装置。

【請求項29】前記蛍光性分子からの蛍光を集光しつつ反射する手段を前記基板と前記第2の手段都の間にさらに有する請求項27記載の核酸の塩基配列測定装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は塩基の光学的識別装置に関するもので、特に遺伝子を構成する塩基(ヌクレオチド)の蛍光あるいは発光検出による識別に用いられる。

【0002】

【従来の技術】遺伝子の組成物質であるDNA(デオキシリボ核酸、塩基を主成分とし、これに糖、リン酸が付いている)は2重らせん状態になっており、このらせん状態に遺伝情報が入っている。その遺伝情報はDNAに1つずつ暗号(塩基配列)のような形で入っており、生物の細胞核の中に遺伝子がひも状に連なって群集している。微生物のような下等生物であれば数千塩基対程度ですが、遺伝情報の多い高等生物には数億ないし29億の塩基対も存在する。

【0003】遺伝子の主体であるDNAの遺伝情報は、核酸を構成するアデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)の4種類の塩基(ヌクレオチド)の配列いかんにより決まっている。したがって、この配列を知ることが、今後の遺伝子工学、医学等を発展させる上で、極めて重要になっている。

【0004】ところで、上記の塩基は、それぞれ個性的な蛍光を生成することが知られており、特に低温(<100K)で蛍光収率が大きくなる。これによって塩基を分別することが原理的には可能である。蛍光を生成する

ためには、励起光を照射することが必要であり、この蛍光の検出には光電子増倍管(ホトマル)のような高感度の検出器を用いるといい。单一蛍光分子を検出する装置として、例えば文献「Proc.Natl.Acad.Sci.USA_86(1989)4087-91」のものが知られている。ここでは、図20に示すように微粒子を供給するフローセル61に対し、流れの方向と直交する方向に光源からの励起光(レーザービーム)が照射され、励起光の照射方向と流れ方向の双方に直交する方向で、蛍光をホトマル63により検出している。

【0005】また、單一フラグメントの各塩基を固定可能な蛍光染料で修飾する方法がある(特開平3-100945, United State patent 4,962,037)。この方法では、同様の構成で、各塩基をそれぞれ特徴的な蛍光色素でラベルした後、エキソスクレアーゼIIIによって各塩基を切断して、蛍光スペクトルのちがいを利用することより、塩基配列を決定している。

【0006】もうひとつの單一分子検出として有機单分子(パラターフェニル)中の不純物法後続元素(ペンタセン)の超高分解能スペクトル分光によるアプローチがある(J.Chem.Phys.95(10), 15 Nov. 1991 7150-7163)。この方法は、塩基の検出に適さないが、ペンタセンの蛍光励起スペクトルを極低温下(4K)で測定し、不均一広がりに埋もれた均一広がりのスペクトルを測定してそれを單一分子の蛍光スペクトルとしているものである。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】フローにする利点は、色素の劣化が抑えうることと色素循環系にフィルタを付けることによってごみを取り除くことができる点にある。しかし、励起光が照射されている領域を分子が通過する時間(μsec程度)だけしか蛍光の観察ができない。そのため、上記の従来装置では、遺伝子の有する塩基からの蛍光を、正確かつ効率よく検出できない。1個のDNAの有する塩基はA、G、C、Tの4種類のみであって、しかも極めて多数である反面、そのサイズは極めて微小で、生成される蛍光も極めて微弱だからである。励起光のビームを塩基が通過するほんの一瞬の蛍光検出では、その種類が分別できないのである。

【0008】もっとも、塩基の流れに対して、流れ方向の広い範囲で励起光を照射すれば、蛍光の生成可能時間を長くし、効率を高めることもできる。しかし、このようにした場合には、次々と供給されてくる塩基を同時に検出することになり、得られたデータの処理が難しくなる。

【0009】そこで本発明は、核酸の單一フラグメントを構成している塩基(A, G, C, T)の配列決定を最終的な目標とする方法であって、遺伝子の有する塩基の種類を正確かつ迅速に識別できる方法を提供することを目的とする。また、この方法を実現するにあたって蛍光検出あるいは発光検出に、單一分子を検出するための

光学的識別装置を提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明の单一分子検出方法は、蛍光性の分子の溶液を微小な液滴状態にして鏡面度の高い基板の表面に付着させた後、自然乾燥をし、基板の局所領域に励起光を照射して蛍光性の分子からの蛍光強度を測定し、量子化された蛍光強度の出現頻度から局所領域の中の蛍光性の分子が单一の分子の状態であることを検出する。

【0011】蛍光性の分子は、蛋白に蛍光分子が結合したものであることを特徴としても良い。蛍光分子そのものでもよい。

【0012】蛍光性の分子は、複数の蛍光分子を含むことが可能であり、クロマトグラフィで特定数の蛍光分子を結合したものを分離精製して溶液を調製することを特徴としても良い。

【0013】蛍光性の分子の溶液は、微小な液滴状態で蛍光性の分子を平均1個程度になる濃度であることを特徴としても良い。

【0014】蛍光性の分子の溶液を高純度の溶媒で希釈することを特徴としても良い。

【0015】超音波にて蛍光性の分子を微小な液滴状態にすることを特徴としても良い。

【0016】蛍光性の分子を霧状に気体に分散させて前記基板に付着することを特徴としても良い。

【0017】基板は、シリコンウェハであることを特徴としても良い。

【0018】自然乾燥は室温若しくは室温以下で行うことを特徴としても良い。

【0019】励起光は、レーザ光であることを特徴としても良い。

【0020】蛍光強度を測定する検出器を励起光の前記基板への光路及び励起光の基板からの反射光路以外に配置して蛍光強度を測定することを特徴としても良い。

【0021】蛍光強度は、2次元のフォトカウンティングシステムによって検出し、画面上における蛍光強度の頻度から、その画面において蛍光性の分子が单一の分子の状態であることを検出することを特徴としても良い。

【0022】また、本発明の单一分子検出用試料の作成方法蛍光性の分子を超音波にて霧状に気体に分散させて鏡面度の高い基板に付着した後自然乾燥することを特徴とする。本発明の单一分子検出用試料は、シリコンウェハの表面上に蛍光性の分子を付着させたものである。

【0023】そして、本発明の单一分子検出装置は、蛍光性の分子を有する試料が付着した基板の局所領域に励起光を照射する光源と、局所領域内の蛍光性の分子からの蛍光強度を検出し、前記蛍光強度の頻度を測定する蛍光検出手段とを有し、蛍光検出手段は、励起光の基板への光路及び励起光の基板からの反射光路以外の位置に配置される。

【0024】蛍光検出手段は、光学顕微鏡及び2次元の光検出器を含むフォトカウンティングシステムで構成されていることを特徴としても良い。

【0025】光学顕微鏡は、その倍率をかけることが可能であることを特徴としても良い。

【0026】基板は、清澄な雰囲気に配置されることを特徴としても良い。

【0027】光源は、レーザであることを特徴としても良い。

【0028】基板上の局所領域を相対的に移動させる手段をさらに備えることを特徴としても良い。

【0029】また、核酸の塩基配列決定方法は、核酸の塩基を含む蛍光性分子の溶液を微小な液滴状態にして順次鏡面度の高い基板の表面に付着させた後、自然乾燥をし、基板の局所領域に励起光を照射して前記蛍光性分子からの蛍光強度を測定し、量子化された蛍光強度の出現頻度から局所領域の中の前記蛍光性分子が单一の分子の状態であることを検出し、蛍光性分子にパルス状に励起光を照射して蛍光性分子からの蛍光の波長分布及び寿命

20 から蛍光性分子に含まれる核酸の塩基を特定し、基板上の局所領域を移動させて順次核酸の塩基配列を決定する。

【0030】基板をシリコンウェハとし、その周に沿って蛍光性分子を付着することを特徴としても良い。

【0031】蛍光性分子の溶液を超音波にて蛍光性の分子を平均1個程度含む微小な液滴状態にして基板に蛍光性分子を付着することを特徴としても良い。

【0032】蛍光強度、蛍光の波長及び寿命を測定する検出器を励起光の基板への光路及び励起光の基板からの反射光路以外に配置して蛍光強度、蛍光の波長分布及び寿命を測定することを特徴としても良い。

【0033】蛍光性分子は、塩基にモノクロナル抗体が付着したものであることを特徴としても良い。

【0034】蛍光性分子は、抗体の連鎖反応による分子増倍過程にて形成されたものとしても良い。

【0035】本発明の核酸の塩基配列測定装置は、核酸の塩基を含む蛍光性分子の溶液を付着した基板の局所領域に励起光を照射する光源と、局所領域内の蛍光性分子からの蛍光強度を検出し、蛍光強度の頻度から局所領域の中の蛍光性分子が单一の分子の状態であることを検出する第1の手段と、蛍光性分子にパルス状に励起光を照射して蛍光性分子からの蛍光の波長及び寿命を検出する第2の手段と、基板上の局所領域を移動させる第3の手段とを有し、第1及び第2の手段は、励起光の基板への光路及び励起光の基板からの反射光路以外の位置に配置される。

【0036】第1及び第2の手段は、蛍光性分子からの蛍光を集光する光学顕微鏡を共用し、この光学顕微鏡を経た蛍光から検出するとしても良い。

【0037】蛍光性分子からの蛍光を集光しつつ反射す

る手段を基板と第2の手段との間にさらに有するとしても良い。

【0038】

【作用】本発明の單一分子検出方法及び装置では、背景光が十分に抑えられ、蛍光が蛍光分子の個数を反映した量子化された状態で観測され得る。ここで、溶液を微小な液滴状態で付着することで、付着した部分での分子数を1個程度にすることが可能であり、基板上に分子を散在させることができ。また、自然乾燥することで、蛍光性の分子の状態を良好に保ち得る。そして、基板の局所領域への励起光の照射により、十分強い励起光を蛍光性の分子に与えることができ、基板が表面度が高いこと及び検出器の配置から検出器への背景光が非常に小さなものになる。

【0039】本発明の核酸の塩基配列決定方法及び装置では、基板上の塩基を含む蛍光性分子が單一の分子状態であることを確認してから、蛍光の波長及び寿命を測定する。そして塩基の種類を特定する。ここでも、同様に、基板上の分子数の制御、分子の散在、蛍光性の分子の状態、励起、背景光の抑制などについての利点がある。基板上の局所領域を移動させることで、順次基板上の蛍光性分子について測定を行って塩基配列が決定される。

【0040】

【実施例】單一分子の位置の測定は、前述の従来技術でものべたように、いまだ未開拓で、現在研究が行われている分野である。單一分子の位置の測定方法は本発明の重要な部分であるので、まず、本願発明者の行った單一分子の位置の測定方法及びそのための装置について説明する。

【0041】(單一分子の検出) 図1は、本発明の單一分子検出方法において使用する装置の構成例を示したものである。この装置は、試料の分子が表面に付着したシリコンウェハ(以下、基板とする)20の表面に励起光を照射する励起光源として励起光源30と、励起光の照射位置で塩基からの蛍光を検出する手段としてフォトンカウンティングカメラシステム(カメラヘッド40、顕微鏡筒41、対物レンズ42、カメラコントローラ44、コンピュータ45、モニタ46、MOディスクユニット47)とを備えている。基板20は、クラス1000以下のクリーンブースに配置され、清澄な雰囲気におかれている。この装置は、核酸の塩基だけでなく、蛍光を発するものであれば、蛋白を始めとして様々なものを試料として用い得る。また、蛍光を発しないものであっても、蛍光性物質と結合させて同様にして用い得る。

【0042】励起光源30は、位置が検出できれば良いので、励起光を基板20の塩基の付着位置に連続的に強い光、例えば、コーヒーレントなレーザ光を照射するものが望ましい。そのため、ここでは、波長488nmのアルゴンガスレーザ(Spetra-physics 2030)を較正済み

のパワーメータ(Spetra-physics 385)で7~20mWの平均パワーに調節して使用する。そして、30ないし50cmの焦点距離のレンズで集光して照射している。励起光源30と基板20の距離はレンズの焦点距離よりも小さくし、基板20上に励起光が均一に照射されるようしている。また、励起光源30は、励起光が図11のように斜め方向から入射するように配置されており、基板20での反射光ビームが斜め方向に反射するようになっている。

【0043】フォトンカウンティングカメラシステムは、基板20の試料の位置を検出するもので、微弱な光を検出できるものを用いる。ここでは、光学顕微鏡41、42を装着した浜松ホトニクスのイメージング・画像解析システム(ARGUS 50 VIM 3)で構成し、2次元的に光子を計数して2次元的に微弱な光検出が可能になっている。光学顕微鏡41、42は、基板20の試料からの蛍光を集めるためのもので、ここでは、40倍(0.55NA)或いは100倍(0.75NA)の対物レンズ(NIKON)を有するものを用いて構成している。カメラヘッド40には、512×512画素で高感度のもの(VIM 3)が用いられ、40倍の対物レンズでの1画素の幅0.3μmとしている。基板20からの蛍光がカメラヘッド40で画像信号に変換され、カメラコントローラ44、ペーンナルコンピュータ45、MOディスクユニット47、モニタ46で信号の蓄積(蛍光のフォトンカウンティング)、画像処理、記録の保存、画像の表示がなされる。

【0044】また、基板20は、図示せぬ駆動装置により位置及び回転が制御され、光学顕微鏡20、カメラヘッド40の視野に入る基板20上の位置が制御されるようになっている(図11)。

【0045】なお、カメラヘッド40の受光面と光学顕微鏡20との間41には、試料特有の蛍光以外の光を遮断するための波長選択手段を設け、励起光の散乱光の入射がないようにすることも可能である。この場合、波長選択手段41は、波長選択フィルタ及びダイクロイックミラーで構成される。これとレーザビームの傾斜によって、背景光となるレーザ光及び基板20表面での散乱光の入射が抑えられる。

【0046】つぎに、この装置を用いた單一分子検出方法を手順を追って説明する。

【0047】まず、試料を所定の溶媒に溶解・希釈する。溶液を基板20に試料溶液を霧状にして液滴22を付着し(図2)、清澄な雰囲気で自然乾燥して試料が付着した基板20を作成する。溶媒は高純度のものを使用し、顕微鏡41、42の解像度程度の領域内に入る分子が1個となるように希釈する(この点に付いては後述)。自然乾燥によって、前述のものと比較して背景光の原因の一つとなる溶媒のラマン散乱が溶液系に比べて低減し、色素分子の劣化の原因となる溶媒と試料分子との反応が大幅に回避される。また、加熱や真空乾燥して

乾燥されれば、試料分子がなくなってしまう可能性が高い。基板20にシリコンウェハを使用するとそのダーリングボンドにより試料分子が固定され、試料が解離しにくいものになる。そのため、この基板は繰り返して使用できる。

【0048】図1の装置に基板20をセットし、レーザ光を照射しながら基板20上の発光する領域を測定する。ここで、レーザ光は、斜め方向に入射・反射するので、顕微鏡20の視野に入らず、背景光が非常に小さくなっている。特に、基板20がシリコンウェハのように鏡面度が高いので、散乱光が小さくなり、さらに、基板20表面上には溶媒分子が存在しないので、ラマン散乱が少なく、1分子からの蛍光を捕らえ得る程度に背景光が小さくなっている。そして、フォトンカウンティングカメラシステムでは、画面ごとに蛍光強度とその強度の蛍光が現れる頻度が測定可能になっており、これらからどこの位置に單一分子が存在するかが検出される。

【0049】この單一分子の検出について実際の測定結果をもとに詳述する。

【0050】基板20において、レーザ光(TE Mode)の不均一性などに基づく光検出効率の位置依存性が生じる場合があるので、それを予め測定しておく。基板20をおく位置にすりガラスにおいて、488 nmにおけるレーザ光の散乱を観察する。512×512画素のうち有効な部分にしるしをつけておく。有効な部分の明暗の差は多くとも10%程度である。

【0051】ここでは、單一分子の検出対象としての蛍光物質には、蛍光性のd-ビオチン(d-Biotin, FLB)とダイソジウムフルオレセイン(disodium fluorescein, DFL)を用いた。FLB及びDFLは水溶液中で493 nmの吸収ピークと($\epsilon = 85,000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ at pH=8.4)、493 nmの発光ピーク($\Phi \sim 0.9$ at pH=8.4)を持つ(Hitachi 557, Hitachi 850での測定値)。ストレプトアビシン(Streptavidin, SA)は4量体蛋白(分子量 $4 \times 15,000$)であり、FLBに対し高い親和性(解離定数 $k_d = 10^{-15} \text{ M}$)を持つ。FLBの一部(B)とSAは特異的な反応をし、FLB/Bを4分子結合し得る(アビシン-ビオチン複合体を形成する)。この反応は、SAと結合する染色分子の数を制御するために利用し得る。FLB/Bの混合比(モル比)を制御することによってSAと結合するFLB分子の数を1~4にすることができる。これらを試料に用いて單一分子の検出を行った。

【0052】まず、基板20に試料溶液を霧状にして液滴22を付着し(図2)、自然乾燥して試料が付着した基板20を作成した。ここでは、超音波加湿器(Sharp HV-A200)を用いて試料溶液を無数の微小の液滴22状態即ち霧状にし、自然乾燥は清澄な霧囲気で行った。自然乾燥によって、前述のものと比較して背景光の原因の一つとなる溶媒のラマン散乱が溶液系に比べて低減し、

色素分子の劣化の原因となる溶媒と試料分子との反応が大幅に回避される。また、加熱や真空乾燥して乾燥されれば、試料分子がなくなってしまう可能性が高い。

【0053】上記の試料は、超純水(Mili-Q water, Milipore)を用いて薄める。ナノモル/1オーダの濃度にすることができ、後述するように1個の液滴に含まれる色素の個数は概算できる。水溶液のウェハ(基板20)への噴霧、自然乾燥を幾つかの試料について繰り返し、296 Kで測定を行った。ウェハに噴霧する溶液をつぎのようにして調製した。

【0054】SAを磷酸塩10 mMとNaCl 0.15 Mとの混合水溶液(pH 7.5)にSA(Vector Laboratory)を溶かし(2 mg/ml)、同様の緩衝液(磷酸塩, NaCl)にFLBとBとを溶解させた。ここで、FLBとBとのモル比を4:0, 3:1, 2:2, 1:3の4種類のものを調製した。FLBとSAが十分に反応するためのモル比は20:1とした。SA溶液100 μlに上記4種類のFLB/B溶液を混合した。そして上記緩衝液を加えて200 μlに調製した。277 Kで4時間放置した後、十分に反応したSAと未反応若しくは十分に反応していないものを分離するために、SA-FLB/B混合溶液をゲルろ過カラムにかけた(Superose 12, Pharmacia, ピーズサイズ1.0~1.1 μm, カラムサイズ1.2×30 cm, 数12)。展開液(移動相)として10 mMの炭酸アンモニウムまたは磷酸塩(NaClを含まないもの)の溶液を用いた。SA/B化合物の寿命はおよそ2.9日なので、用意した試料にて1両日中に測定を行った。

【0055】DFL(Exintion)は、噴霧する液滴の大きさを見積るために用いる。2.3×10⁻⁵ MのDFL溶液をウェハ(基板20)に霧状にして付着し、図1の装置にセットした。そして、レーザ光を照射しながらフォトンカウンティングカメラシステムで蛍光が生じる領域の大きさ(pixel²)を測定した。液滴の接触角度を90度と仮定して、その領域の大きさを半球状の液滴22aの体積に変換した(図2)。DFLも單一分子検出の試料に用いた。

【0056】これらの試料を用いたのは生物学的応用と光物理的な応用とを意図したからである。第1の試料(SA, FLB, B)については、ラベリングを施して検出するイムノアッセイやDNA配列の測定への応用である。第2の試料(DFL)については光物理学的研究への応用を念頭においたものである。

【0057】アビシン-ビオチン複合体形成の技術は、SAとFLB/Bの化学量論的な複雑な組成に基づく。SA分子の4サイトに結合するFLBの数は、493 nmと280 nmにおける吸光度(A(493), A(280))の比を計算することで測定することができる。493 nmにおける光吸収はFLBのみによるものであり、280 nmにおける光吸収はFLB及びBのみによ

るものである。D-ビオチン (D-biotin) は 200~900 nm で光吸収はない。しかし、ペールの法則 (Beer's law) は、SA の存在の下で FLB では満たされない ($3 \sim 12 \mu\text{M}$ Min 1.0 mM tryethanolamine/HCl, pH=8.42)。

【0058】図3 (a) は、SA に混ぜた FLB/B の吸収スペクトルを示したものである。FLB/B と SA の複合体においてこれらの比が丁度 4:1 の場合を示したもので、これらはまったくカラムクロマトグラフィーを行なわないで測定されたものである。ペールの法則からはずれるのに加え 493 nm の半値幅が図3 (b) に示すように FLB の増加とともに増加している。一方、図4 (a), (b) は、FLB のみの時にはペールの法則に従い、図3 (a), (b) と同じ濃度の範囲では、半値幅の拡大が起こらないことを示している。SA と結合する FLB の数は、FLB の寄与を含んだ A (493) と A (280) の比を参考することで得られる。A (280) から FLB の寄与を差し引くことは、SA が存在しないときの FLB の吸収スペクトルは SA の存在下のものと比較できないので、非現実的で非実際的である。また、FLB/B の場合は、280 nm 近傍においてトリプトファン (tryptophan) のレッドシフト (低波長側へのずれ) をもたらす。このことから、混合溶液において FLB/B が SA と完全に結合したと仮定して、A (493) と A (280) の比を図3 から求めて、これを用いて FLB の数を見積ることができる。

【0059】SA を FLB/B と化学量論的な反応をさせるためには反応時間が重要なものになる。原因は不明だが、1晩かそれ以上反応溶液を放置すると SA と結合する FLB/B の数が減少した。A (493) と A (280) の比は、クロマトグラフィーのフラクション数 (fraction number) に依存する。図5の黒丸印は、フラクションのうち A (493) と A (280) の比が最も大きいものについて示したものであり、このフラクションを用いた。4FLB, 3FLB/B, 2FLB/2B, FLB/3B の比においては、SA と FLB/B のモル比を丁度 1:4 に混合した場合を標準値としたものとなり良い一致を示す。一方、3FLB/B の場合は、明らかに外れたものになっていて、これは試料調整のたびごとに違ったものになっていた。クロマトグラフィーの際ににおいて SA から FLB/B が分離してしまうことに起因するものと考えられる。

【0060】水中での染料分子では特にペールの法則からはずることが知られている。有機染料の過去の幾つかの研究によれば、濃度によって吸収スペクトルが著しく変化することが分かっている。Foster と Konig は、蛍光物質を含むいくつかの有機染料分子の水中の吸収スペクトルの変化から高い濃度 ($10^{-3} \sim 10^{-1}$ M) では 2 量体を形成していることを報告している。また、Koizumi と Mataga は、電解質ポリマーの存在の下での染料水溶

液の吸収スペクトルの変化について報告している。これらの研究から、スペクトルの変化はポリマーに与える染料分子の凝集効果に起因すると考えられる。これらの過去の研究と、SA と B の高い親和性による結合をふまえて、同様に、SA に対する FLB の局所的な凝集効果が十分有り得るものであると考えられる。このことは、SA と FLB の相互作用について分光学的証拠もある。例えば、FLB と親和性をもたないウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin) では、FLB に何らスペクトルの変化をもたらさない。

【0061】つぎに、SA に結合した FLB の相対的な蛍光量子生成率と蛍光スペクトルを測定した。吸収スペクトルの異常な振る舞いを考慮すれば、SA との結合の際に FLB の蛍光特性に何かが起こっているものと考えられる。図6は、FLB のみのとき (1)、SA と結合した FLB/3B のとき (2)、SA と結合した 2FLB/2B のとき (3)、SA と結合した 3FLB/B のとき (4)、SA と結合した 4FLB のとき (5) について蛍光スペクトルを示したものである (SA との結合は pH 8.42, 296 K で 1.0 mM のトリエタノールアミン (triethanol) / HCl に溶解しておこなった)。スペクトルの形状は同じであり、ピークもシフトしていないが、最初の FLB が SA に結合した時強度が顕著に減少しさらに FLB が結合するにつれてかなり減少した。(1) ~ (5) から得られた SA による相対的な蛍光量子生成率を計算したものを図6 (b) に示す。この SA のクエンチングによる蛍光は、SA のアミノ酸と FLB との間に、消光反応があることを示している。FLB の数に依存したクエンチングによる蛍光のメカニズムは、染料水溶液での自己クエンチング (self-quenching, 上述の過去の研究で報告されている) と同じものであるものと考えられる。この点に付いてさらなる研究は今後に委ねられよう。

【0062】溶媒のないシリコンウェハ上でも溶液中の相対的な蛍光量子生成率と等しいことは知られていないのであるが、単一分子検出に適切な試料の選定を図6の結果の下に行った。蛍光量子生成率と蛍光係数は FLB の数とともに減少するので、モノマーの FLB/3B についてのみ単一分子検出の確認のため測定をし得る。これらのことから単一分子検出にはモノマーを試料として用いることとした。

【0063】この単一分子検出では、液滴は染料分子の数が少数となるようにしなければならない。液滴中では、染料分子の数はボワッソソに支配されるので、これを用いて液滴中の染料分子数を計算することができる。染料溶液 (DFL) を高濃度にし、その液滴を超音波加湿器でシリコンウェハに付着した。図7 (a), (b), (c) は、噴霧する時間を 10 秒、7 秒、3 秒にかえて液滴 1 つが基板上に占める領域がどの様に分布するかを示したものである。領域の大きさ (in pixel²)

`nit,1pixel=0.3 μm` に対する頻度 (frequency) を示す。ピークの位置は噴霧する時間が長くなるにつれ少し移動するが、実際には分布の形及びピークの位置は噴霧する時間とは独立している。最大のピークは、およそ $30 \sim 40 \text{ pixel}^2$ であるので、染料の濃度をナノモル/1程度にすると、液滴1つにはいる染料分子数は $1.0 \sim 1.56$ になる。

【0064】こうして分子数を非常に小さくして液滴を基板20（シリコンウェハ）に付着したのち、図1の装置で100以上の基板20上の発光する領域を測定した。そして、蛍光強度（INTENSITY）とその強度の蛍光が現れる頻度（FREQUENCY）とをプロットした（蛍光強度については相対値を用いた）。

【0065】図8(a), (b) は、SAと結合したFLB/3Bを用いた測定結果を示したものである（顕微鏡は40x, 0.55NAとした）。500おきに幾つかのピークが現れ、これは蛍光が量子化され、この測定が、単一分子領域で蛍光を捕らえていることを反映している。横軸の500よりも小さいものは、シリコンウェハに付着した水や緩衝液中のダストによる488nmの光の散乱に起因するものであるが、図8(b)の横軸の500において明瞭にピーク値の最小値が現れている。このピークは、FLB/3Bと結合したSAの単一分子から生じたものと考えられる。図8(a)と(b)とでは、それらのカラムクロマトグラフィでの緩衝液が違つ

$$W(N) = \mu^N$$

【0070】ここで、 $W(N)$ は液滴が含む分子数の期待値、 μ は液滴中の分子数の平均値をしめす。噴霧する際、液滴の大きさにバラツキがあるので、液滴大きさの分布の重みを加味してつぎのポワソンの式で示され

$$W(N) = \sum_{\mu} f(\mu) \frac{\mu^N e^{-\mu}}{N!} \quad (\text{式 } 1)$$

【0072】

【数3】

$$\sum_{\mu} f(\mu) = 1 \quad (\text{式 } 3)$$

【0073】ここで、 $f(\mu)$ は規格化された重み係数であり、図7の液滴の大きさの分布から計算される。図10は、 $W(N)$ の計算結果をDFLについての測定結果（斜線）と共に示したものである（ここでは、 $N=1$ の頻度を規格化してある）。これらは良い一致を示しており、単一分子の検出がなされていることを如実に示している。

【0074】このようにして、蛋白に結合する染料分子と、希釈した染料分子との2種類の試料について単分子

たものになっている。図8(a)ではリン酸塩 ($pH=7.5$)のみを用い、図8(b)では炭酸アンモニウムを加えている ($pH=7.5$)。炭酸アンモニウムの揮発性によって基板表面に検出した緩衝液の塩による光学的なノイズが抑えられているものと考えられる。

【0066】図9は、DFLのみを使用した場合の結果を示したものである（顕微鏡は100x, 0.55NAとした）。この場合においても、10,000おきに幾つかのピークが現れ、蛍光が量子化されている。シリコンウェハへの水だけを噴霧するという実験によって、8,000以下における蛍光強度の異常は水の中のダストによることが分かる。強度10,000の蛍光は、DFLの単一分子から生じたものと結論できる。

【0067】図8と図9において蛍光のフォトンカウティングの絶対強度の違いは、顕微鏡の対物レンズ、検出器の感度のレギュレーション、シリコンウェハ表面へのレーザ强度、FLB/3Bと結合したSAと何も結合していないDFLと蛍光量子生成率といった実験条件の違いによるものである。

【0068】量子化された蛍光強度は、図7(a)に示された液滴の大きさの分布から計算できる。液滴中の分子数はポワソンの式で示される（式1）。

【0069】

【数1】

$$e^{-\mu} / N! \quad (\text{式 } 1)$$

30

る。

【0071】

【数2】

$$\mu^N e^{-\mu} / N! \quad (\text{式 } 2)$$

の検出を行うことに成功した。後者のほうは分子間の相互作用がなく、単分子の検出に向いている。実際の応用場面では、蛍光クエンチングをもつ分子間の相互作用がある場合が多く、前者はその典型的なものひとつである。

【0075】従来は、背景光が大きく単一分子からの蛍光はそれに埋もれて検出することが不可能であった。しかし、この単一分子の検出では、これを可能にし、大きなブレークスルーで、様々な分析に応用され得る。イムノアッセイ、クロマトグラフィ、DNA解析の自動化に大きな進歩をもたらすものと思われ、超高速の蛍光分析を可能にし得るものと考えられる。

【0076】このように、室温で固体基板表面に試料を

50

付着すること、2次元フォトンカウンティング法を用いて単一分子の存在及び位置を検出していることで単一分子の検出を可能にしている。単一分子の存在及び位置は、従来通りの光学顕微鏡を用い、その解像度の限界での蛍光スポットから検出している。蛍光スポットは、顕微鏡視野内に散在し、蛍光スポットに存在する分子の個数については、単一分子の検出の際非常に重要な要素であり、蛍光スポットからの蛍光強度の大きさを左右することになる。上記方法で分子1個程度が蛍光スポットに存在するようにし、単一分子の検出を可能にしている。

【0077】従来のウェット系、溶媒に測定対象の分子を溶解させるものでは、溶媒（水など）のラマン散乱がバックグラウンドノイズとなり、測定を非常に難しいものにしていたが、本発明の方法では、適切な基板の選択により良好に単一分子の検出を可能にしている。また、基板上に超音波（超音波加湿器など）をもちいるのは、非常に簡便で有用なものである。緩衝液に由来する塩は、測定対象の分子とともに基板上に存在する場合があり、これがバックグラウンドノイズのレベルを決めてしまうことがある。試料調整の際、試料の種類によっては必ずしも緩衝液を必要とするわけではないが、その選択には注意を要する。

【0078】さらに、基板には測定対象の分子が良好に付着しており、他の測定においても使用することが可能である。例えば、STM、ATMは空間分解能の優れた顕微鏡であり、これらの測定にも用い得ることができる。STM、ATMで単一分子の存在を確認し、分子種類の識別は蛍光で行う、というようにしても良い（本発明の検出法は、蛍光で行うので分子種類の識別もできることはいうまでもない）。DNAの塩基配列の一つの決定法にもなり得る。即ち、エキソヌークリアーゼを用いて末端からDNAの塩基を切断し、1個1個の塩基を識別して行くのである。この場合、切断された順序で決まる所定の位置に塩基を配置しておく。

【0079】（核酸の塩基配列の測定）図12は、本発明の核酸の塩基配列決定方法において使用する装置の構成例を示したものである。この装置は、基板20の表面上の微小な領域に励起光を照射する励起光源30と、励起光の照射位置で塩基からの蛍光を検出する手段としてフォトンカウンティングカメラシステム（42～47）とを備えている。基板20は、鏡面度の非常に高いもの、例えば、シリコンウェハを用い、前述の方法で塩基の分子を表面に付着しておく。また、クラス1000以下のクリーンブースに配置され、清澄な雰囲気または真空中におかれている。

【0080】励起光源30は、励起光を基板20の塩基の付着位置に強く照射するもの、例えば、コヒーレントなレーザ光が望ましいため、レーザ光源を用いる。その波長が30μm以下であればパルスレーザを用いることができる。励起光（レーザ光）を30乃至50cmの焦

点距離のレンズ32で集光して照射する。励起光源30と基板20の距離はレンズの焦点距離よりも小さくし、基板20上に励起光が均一に照射されるようにする。また、励起光源30は、励起光が図2のように斜め方向から入射するように配置し、基板20での反射光ビームが斜め方向に反射するようする。

10

【0081】フォトンカウンティングカメラシステムは、基板20の塩基の位置を検出するもので、微弱な光を検出できるものを用いる。ここでは、光学顕微鏡20を装着した浜松ホトニクスのイメージング・画像解析システム（ARGUS 50 VIM 3）で構成し、2次元的に光子を計数して2次元的な光検出が可能なものにし、分子の位置が特定しうるようにする。光学顕微鏡20は、基板20の塩基からの蛍光を集めるためのもので、高倍率にして構成している。カメラヘッド40には、イメージング・画像解析システムがつながれており、これによって信号の蓄積（蛍光のフォトンカウンティング）、画像処理、記録の保存、画像の表示がなされて塩基の分子の存在が検出される。

20

【0082】ハーフミラー56は、基板20上の塩基からの蛍光を分岐するものであり、ポリクロメータ52への光量を多く分岐するものにする。ポリクロメータ52は蛍光のスペクトルを測定し、蛍光寿命測定装置は、蛍光の寿命を測定するもので光電子増倍管（ホトマル）などで構成される。これらによって塩基の種類が特定される。ハーフミラー56に代えて、これらとカメラヘッド40とを光学的または機械的に切り替えるようにしても良い。

30

【0083】また、基板20は、図示せぬ駆動装置により位置及び回転が制御され、光学顕微鏡20、カメラヘッド40の視野に入る基板20上の位置が制御されるようになっている（図11と同様）。矢印A方向に一定速度で走行するようになっている。基板20上の励起光が照射される領域近傍は、冷却手段34で冷却されるようになる。冷却手段としては、クライオスタットの冷却端34aを基板20の裏側に導くようするもの（図13(a)、例えば銅ブロック）、冷却端34aとの間に熱伝導度の高いボール34bを埋め込む（図13(b)）、冷却ガス34dをパイプ34cで導き吹き付けるもの（図13(c)、例えばヘリウムなど）がある。

40

核酸塩基そのものは低温になるほど自家蛍光が増大するので、冷却する温度は低いほうが望ましい。また、冷却によって色素の劣化を抑えることが可能になる。

【0084】つぎに、この装置を用いた塩基配列決定方法を手順を追って説明する。

【0085】まず、図15に示すようにフローセル10を用いて核酸（例えば、DNA）から分離した塩基を含む液滴22を基板20に滴下し、塩基が付着した基板20を作成する（図14）。

50

【0086】フローセル10は、本体11に2個の超音

波トラップ12を挟んで構成される。図15に示すように、各々の超音波トラップ12はピエゾ素子13を有し、配線14を介してピエゾ駆動回路に接続されている。このフローセル10のフロー通路15にDNAを分離した塩基を含んだ液体を流し、ピエゾ素子13によって定在波を作ることにより、図のように液体は分離して滴下される。一方、基板20は、図示せぬ駆動機構により、一定速度で回転すると共に液体の滴下する位置が中心に移動するようとする(図16)。滴下された塩基は矢印A方向(図15)に走行する基板20に略一定間隔で付着し、光学顕微鏡20の視野内に1個の液滴が入るようにする。

【0087】核酸の分離は、前述の文献にあるように、酵素エキソヌクレアーゼIIIを含む溶液を使って單一フラグメントの端から順次切断して行う。約37℃の良好な状態に保つことにより、上記酵素で約100個/sの速度で切断することが可能であり、約300個/sの速度で微粒子状の液滴をフローセル10から滴下させる。また、フローセル10により滴下させる微粒子は、約30μm程度の直径になるように径及び定在波の周波数を調整し、1つの液滴には、ポワソンの式を考慮しておよそ1分子が入るようにしておく。こうして、図14に示すような螺旋状に1塩基が順に付着した基板20が作成される。

【0088】つぎに、基板を自然乾燥させ溶媒を取り除く。基板は、自然乾燥では取り除くことのできない溶媒分子と塩基とが付着したものになる。溶媒分子をあえて取り除こうとすると(加熱、真空乾燥)、試料分子(塩基の分子)も基板上からなくなる可能性は高いので、溶媒分子を付着したままにしている。自然乾燥は、溶媒からのラマン散乱の低減及び色素の劣化の抑制に有効である。ここで、冷却しながら乾燥させても良い。また、基板がシリコンであると良好なものになるのは、ダンギングボンドがアクティブで結合するからであると考えられる。

【0089】こうして塩基を付着した基板を上記図12の装置にセットし、試料分子のうち最初のものを付着した位置近傍に顕微鏡42の視野を合わせる。まず、レーザ光を照射しながら試料分子からの蛍光フォトンカウントリングカメラシステムで検出して基板上の試料分子のうち最初のものを観測し顕微鏡42の視野にあることを確認する。また、分子が1個であることを確認する。分子が1個でない場合、顕微鏡の視野を動かしまたは倍率を変えて1個にする。励起光源30からパルスレーザ光をその試料分子に照射して励起し、ポリクロメータ52および蛍光寿命測定装置53で蛍光波長及び蛍光寿命を測定する。これらの視野内に入ってくるのは1分子からの蛍光になっている。

【0090】ここで、溶媒分子が溶液中に比べて少ないため、ラマン散乱が著しく少なく、背景光が小さくなっ

ている。また、励起光源30からレーザ光は顕微鏡42の視野に入らないようになっており、基板に鏡面度の高いもの(シリコンウェハ)を用いているため、背景光が非常に少なくなる。特に、反射の場合は透過の場合よりも小さなものになる。そのため、試料分子からの蛍光は非常に微弱なのであるが、背景光に隠れずに測定することが可能になっている。また、励起光が反射して蛍光検出器40に入射する確率はほとんどなくなるので、たとえポリクロメータ52のカットオフ特性が完全でなくとも、雜音成分となることはない。

【0091】蛍光波長及び蛍光寿命からこの差異により塩基を前述のA、T、G、Cに識別でき、顕微鏡42の視野にある塩基が、塩基A、T、G、Cのいずれであるかが特定される。なお、蛍光検出は検出期間を長くする必要上、オフラインで行なってもよい。そして、レーザ光の照射領域即ち顕微鏡42の視野をつぎに付着した試料分子近傍に移動させる。同様にして塩基の種類を特定し、つぎの試料の観測を行う。これを順次繰り返して核酸の塩基配列の測定がなされる。

【0092】測定対象の塩基の分子を基板に付着させ、分子の位置情報を得ながら塩基の種類を特定してゆくものであるので、繰り返して測定し直すことができるだけでなく、核酸の記録媒体として用いることもできる。

【0093】上記実施例においては、種々の変形が可能である。

【0094】例えば、基板20は、シリコンウェハが最も望ましいが、平面度・鏡面度が同程度に高ければ、他の半導体や絶縁体、場合によっては金属をも用い得る。但し、アルミニウムや金は蒸着膜として用いられるが、酸化しやすい、傷付きやすい、という欠点がある。酸化シリコンなどをコーティングした金属基板も、鏡面度が高ければ、基板として用い得る。

【0095】顕微鏡42、ポリクロメータ52および蛍光寿命測定装置53の配置を図17に示すようにしても良い。この場合、反射鏡25で試料分子からの蛍光をポリクロメータ52および蛍光寿命測定装置53に反射するようにすることで良好な波長及び蛍光寿命測定ができるようになる。

【0096】さらに、カメラヘッド40は複数個としてもよい。1回の検出で失敗したときには、検出を改めて行なってもよい。なぜなら、塩基はいったん基板20に付着されると、その位置は後に変ることがないので、繰り返して発光あるいは蛍光検出することが可能になる。

【0097】また、塩基A、T、G、Cと結びついて発光する試薬があり、これらを用いて抗体コーティングを施し塩基の検出を増大させることも考えられる。

【0098】均一の分子からなる抗体であるモノクロナル抗A、抗T、抗G、抗Cは、塩基A～塩基Cと特異的に結び付く性質を持っている。これらのモノクロナル抗A～抗Cを基板20にコーティングする(図18)

(a)。そして、フローセル10により核酸の塩基を滴下させると、塩基A～Cは対応する抗A～Cのいずれかと結合する。発光型の抗A～抗Cは、それぞれ図18(b)のように発光性の酵素を有しており、かつ塩基A～塩基Cと特異的に結び付く性質を持っている。発光型の抗A～抗Cを滴下し、余分な発光型の抗A～Cを洗浄して除去する。図18(c)に示すように、基板20に付着したモノクロナル抗Aには塩基Aが特異的に結びつき、さらに発光型の抗Aが特異的に結びつく。また、図18(d)のように、基板20に付着したモノクロナル抗Tには塩基T、塩基Tには発光型の抗Tが結びつく。このため、各々の酵素の発光波長などを変えておくことで、発光検出による識別が可能になる。

【0099】さらに、発光検出を容易にするため、図19のような分子増倍過程を利用してもよい。すなわち、図19の右上に丸印の1～3で示す3種の抗体を用意し、これを基板20に供給する。これにより、抗体の連鎖反応が生じ、重合反応を用いた分子増倍が実現できる。なお、抗原結合部位を認識するための抗体には、抗イディオタイプ抗体と呼ばれるものがある。これによれば、連鎖した分だけ酵素が多くなるので、発光量を増大できる。なお、これらの供給および洗浄についてオンライン・オフラインで行なってもよい。

【0100】

【発明の効果】以上、詳細に説明した通り、本発明の單一分子検出方法及び装置によれば、背景光が十分に抑えられ、直接の測定対象たる蛍光性の分子1個からの蛍光を検出することができる。そのため、蛍光が量子化された状態で観測され得るので、單一の分子状態を検出することができる。

【0101】また、本発明の核酸の塩基配列決定方法及び装置によれば、基板上の塩基を含む蛍光性の分子が單一の分子状態であることを確認してから、蛍光の波長及び寿命を測定するので、その分子に含まれる核酸の塩基を適確に特定することができ、順次塩基を特定して行くことで高速に塩基配列を決定できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の單一分子測定装置の構成例を示した図。

【図2】シリコンウェハ上の染料分子の溶液の液滴のイラスト図である。半球の体積は、液滴が半球状で接触角90度をなしているものとし、揮発後の蛍光を発する領域($s = \pi r^2$)が半球状の液滴の赤道面であるとしている($v = 2\pi r^3 / 3$)。

【図3】(a)は、296Kで10mMのトリエタノールアミン(triethanol)／HClに溶解したFLB／BとSAとの混合物の吸収スペクトルを示した図。FLB／BとSAのモル比は4:1である。D-ビオチン(D-biotin)この領域では光吸収はない。280nm近傍の光吸収は主にSA中のトリプトファン(tryptophan)による。

よる。(b)の黒のプロットは、FLB濃度の増加にともないA(280)が直線的には増加しないことを示す。(b)の白のプロットは、FLB濃度の増加にともない493nmのピークの半値幅が広がることを示す。

【図4】(a)は、pH8.42, 296Kで10mMのトリエタノールアミン(triethanol)／HClに溶解したFLBの吸収スペクトルを示した図。FLB／BとSAのモル比は4:1である。(b)は、(a)においてのスペクトルの変化からFLBの濃度(黒のプロット)とA(493)との間に線形関係があることを示す。(b)の白のプロットは、この場合、FLB濃度に493nmでの半値幅は依存しないことを示す。

【図5】SAと結合したFLB／Bが493nmでの吸収A(493)と280nmでの吸収A(280)とから計算し得ることを示す図。A(493)にはFLBのみが寄与するA(280)はSAとFLBの寄与を含む。A(493)／A(280)の評価はSAとFLB／Bの比を様々なものにしておこなった。黒のプロットは、クロマトグラフィからのFLB／B-SA混合物を用いたもの、白三角のプロットは、SAとFLB／Bの混合比を丁度1:4にしたもの示している。後者をSAと結合したFLBの数を決めるための標準値とした。

【図6】(a)は、FLBのみのとき(1)、SAと結合したFLB／3Bのとき(2)、SAと結合した2FLB／2Bのとき(3)、SAと結合した3FLB／Bのとき(4)、SAと結合した4FLBのとき(4)について蛍光スペクトルを示した図。SAとの結合はpH8.42, 296Kで10mMのトリエタノールアミン(triethanol)／HClに溶解しておこなった。(b)は、(a)の(1)～(5)から得られたSAによる相対的な蛍光量子生成率の変化を示した図。SAとFLB自身による蛍光のクエンチングが明らかに観察された。

【図7】噴霧する時間を10秒、7秒、3秒にかけて液滴1つが基板上に占める領域がどの様に分布するかを示した図。

【図8】SAと結合したFLB／3Bの蛍光強度分布を示した図。

【図9】DFLのみを使用した場合の蛍光強度分布を示した図。

【図10】W(N)の計算結果をDFLについての結果と共に示した図。

【図11】レーザ光が照射される様子を示した図。

【図12】本発明の核酸の塩基配列測定装置の構成例を示した図。

【図13】冷却手段の構成例を示した図。

【図14】塩基が付着した基板20を示した図。

【図15】フローセル10の詳細な構成図である。

【図16】基板20に塩基を付着させるようすを示した図。

【図17】本発明の核酸の塩基配列測定装置のほかの構成例を示した図。

【図18】発光検出の原理を示す模式図である（変形例）。

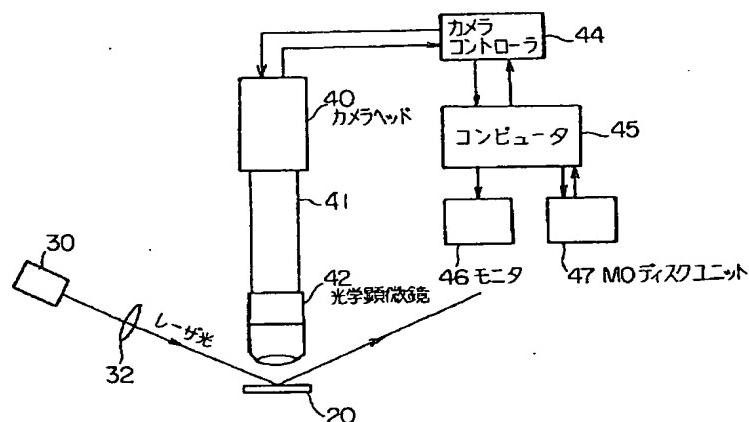
【図19】分子増倍過程の原理を示す模式図である。

【図20】従来装置の斜視図である。

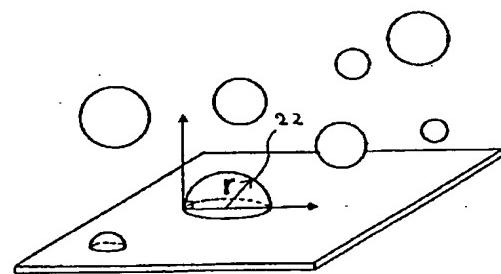
【符号の説明】

10…フローセル、20…基板、30…レーザ光源、40…カメラヘッド、42…光学顕微鏡、44…カメラコントローラ、45…コンピュータ、46…モニタ、47…MOディスクユニット、52…ポリクロメータ、54…蛍光寿命測定装置。

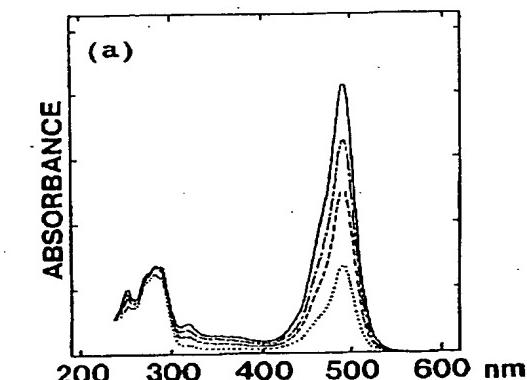
【図1】



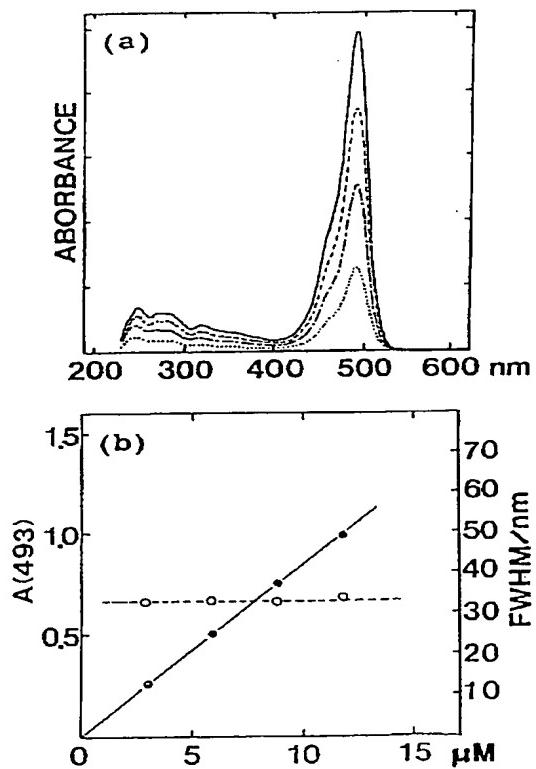
【図2】



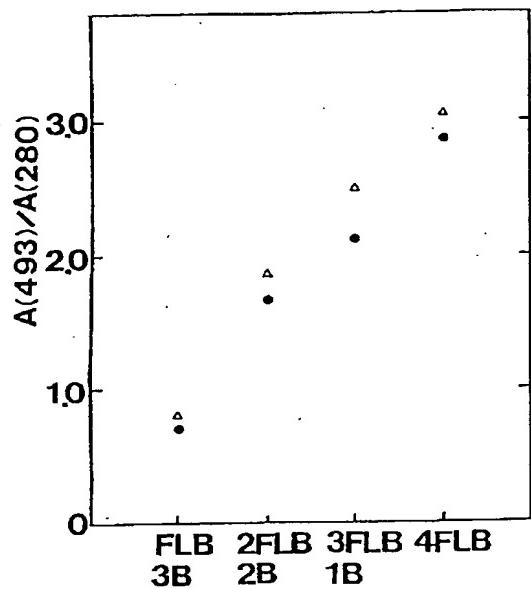
【図3】



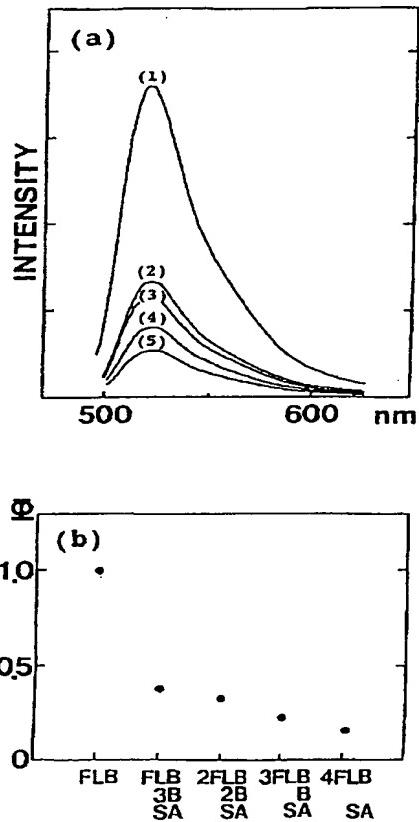
【図4】



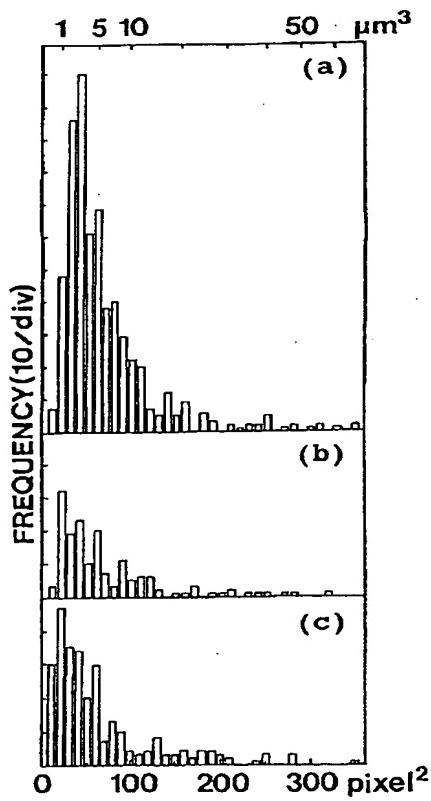
【図5】



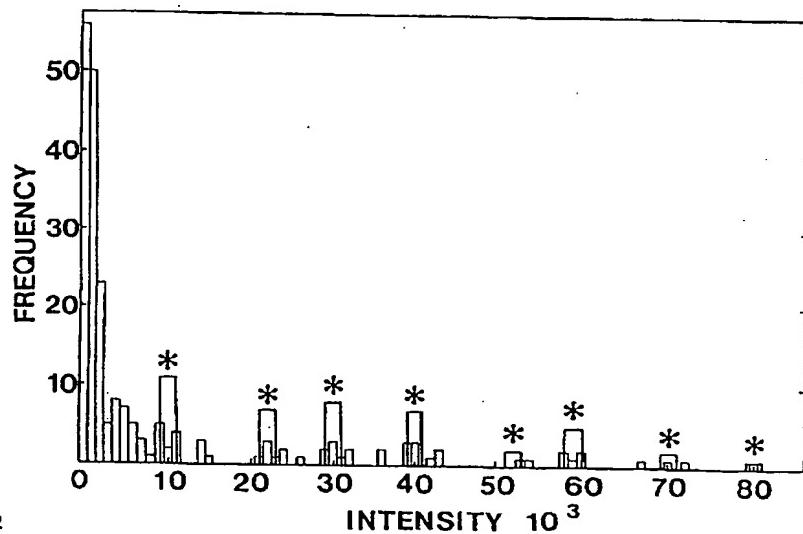
【図6】



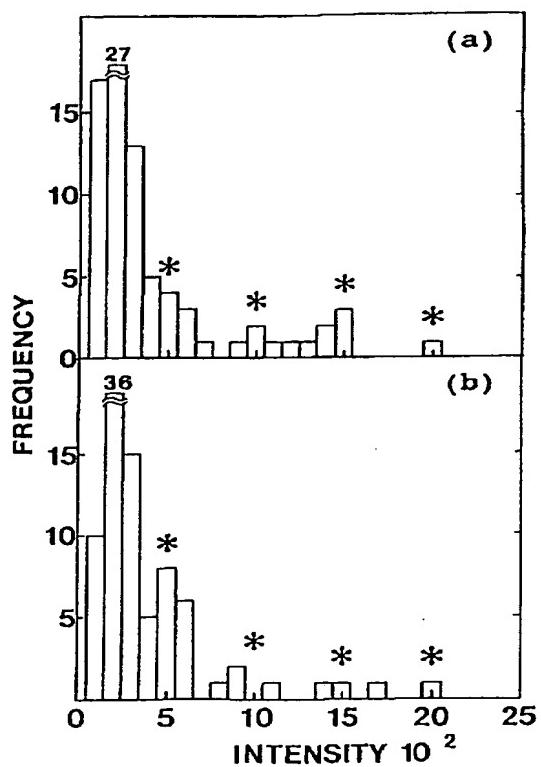
【図7】



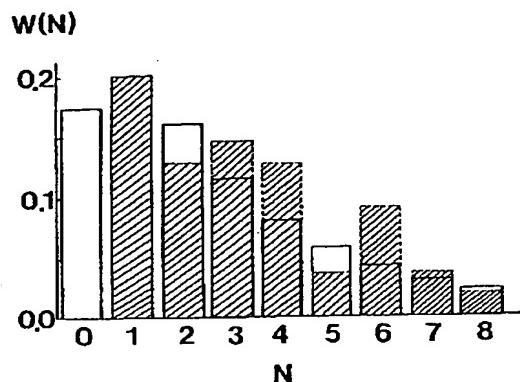
【図9】



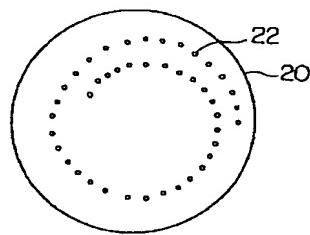
【図8】



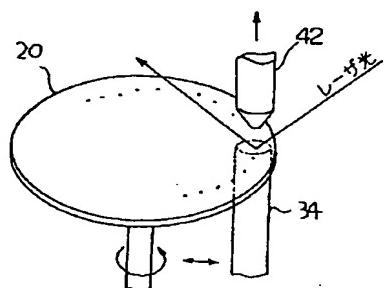
【図10】



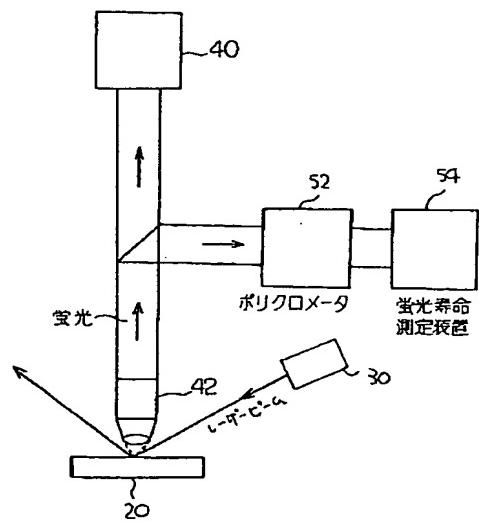
【図14】



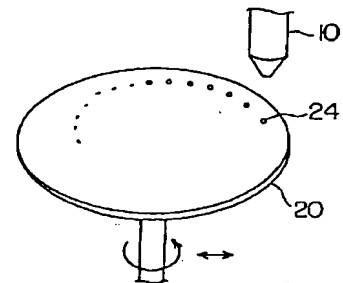
【図11】



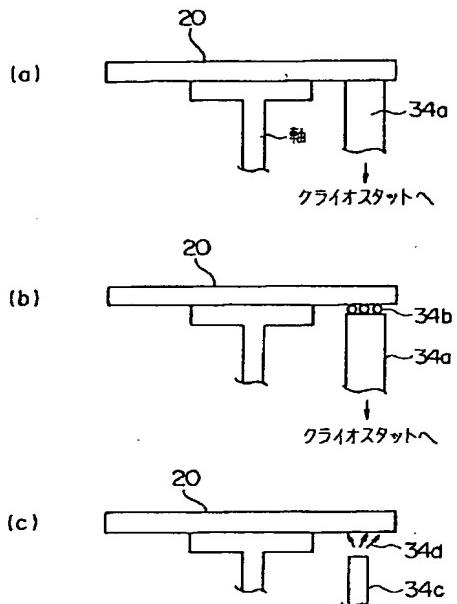
【図12】



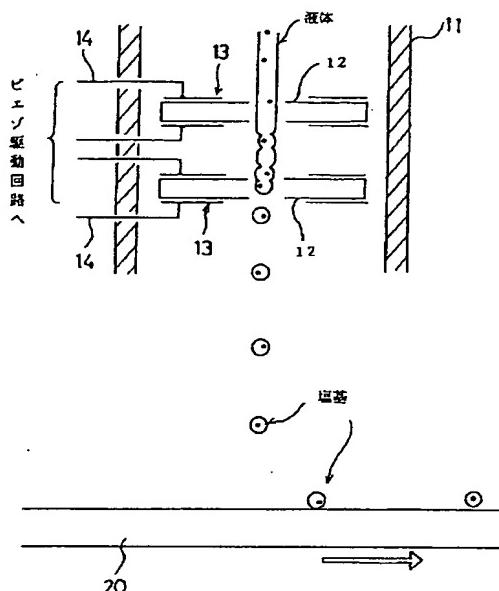
【図16】



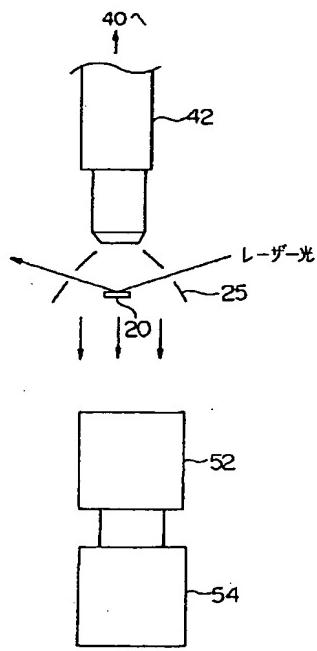
〔図13〕



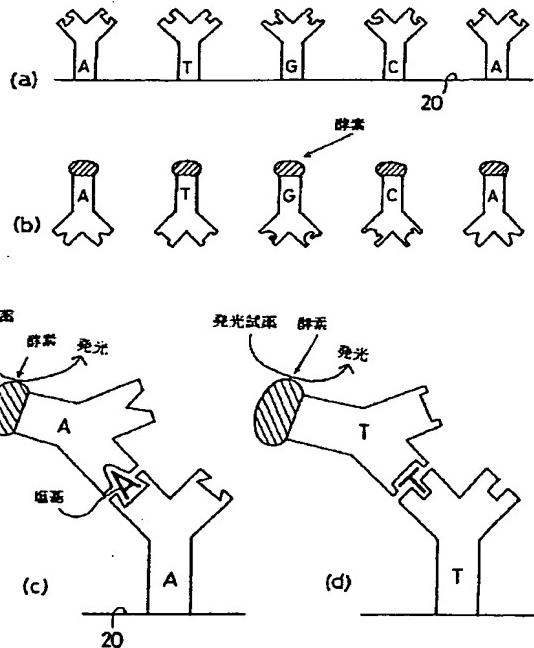
【図15】



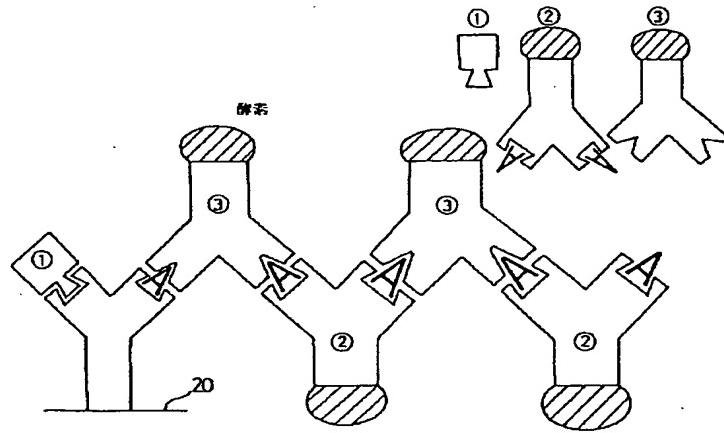
【図17】



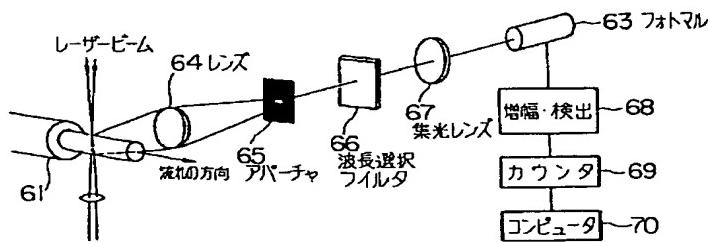
【図18】



【図19】



【図20】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. 5

G 01 N 33/50
// C 12 Q 1/68

識別記号 庁内整理番号

P 7055-2 J
Z 7823-4B

F I

技術表示箇所

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-148076
 (43)Date of publication of application : 27.05.1994

(51)Int.CI.
 G01N 21/78
 C12M 1/00
 C12N 15/09
 G01N 21/64
 G01N 33/50
 // C12Q 1/68

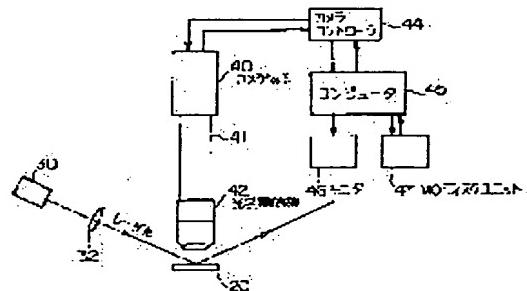
(21)Application number : 04-300134 (71)Applicant : HAMAMATSU PHOTONICS KK
 (22)Date of filing : 10.11.1992 (72)Inventor : ISHIKAWA MITSURU

(54) SEQUENCE DETERMINATION FOR NUCLEIC ACID, METHOD AND DEVICE FOR DETECTING SINGLE MOLECULE, AND SAMPLE PREPARING METHOD

(57)Abstract:

PURPOSE: To detect the position of a single molecule by irradiating a local area of a substrate which has a highly specular surface and to which a sample solution of fluorescent molecules is adhered with exciting light and measuring the frequency of occurrence of a fluorescence intensity.

CONSTITUTION: After a sample is dissolved in a prescribed solvent and the solution is diluted, the diluted solution is adhered to a substrate 20 in an atomized state and the substrate 20 is naturally dried. A high-purity solvent is used for preparing the solution and the solution is diluted so that the number of molecules which get in an area having an extent nearly equal to the resolution of an optical microscope 42 can become one. Then a luminous area on the substrate 20 is measured while the surface 20 is irradiated with laser light from an exciting light source 30, but the laser light does not get in the visual field of the microscope 42 and the background light becomes extremely small, because the laser light is obliquely made incident to and reflected by the substrate 20. Especially, since the surface of the substrate 20 is finished is a highly specular state and no solvent molecule exists on the surface, the quantity of Raman scattered light becomes smaller and the background light becomes less to such an extent that even fluorescence from one molecule can be caught. Therefore, since a photon counting camera system can measure the intensity of fluorescence and the frequency of occurrence of fluorescence of the intensity at every picture, the position of a single molecule can be detected.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 14.11.1994
 [Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 2575270

[Date of registration] 24.10.1996

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office